様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 ２５ 日現在

機関番号：１３７０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０７７４９

研究課題名（和文）細胞が多様な可溶型（プロ）レニン受容体を産生する生物学的意味

研究課題名（英文）Biological implications of cells producing various soluble (pro)renin receptors

研究代表者
中川　寅（Nakagawa, Tsutomu）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：１０２８１０４９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト（プロ）レニン受容体（PRR）を外来性に発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞と切断部位特異的抗体を用いて、PRRがsite-1 protease（RTIL281）とfurin（RKTR278）によって段階的に切断された後、C末端Arg278がcarboxypeptidaseによって除去されることを見出した。ヘパリンカラムクロマトグラフィーにより、C末端Arg278の切除はヘパリン結合能を低下させることが明らかになった。PRRの多段階切断は、細胞が細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと異なる結合性をもつ多様な可溶型PRRを作り出す仕組みとしてはたらいている可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
可溶型（プロ）レニン受容体（可溶型PRR）は、慢性腎臓病、妊娠糖尿病、妊娠高血圧腎症、膵臓癌などの疾病でその血中濃度が上昇することから、これらの疾病のバイオマーカーとなる可能性が期待されている。しかし、可溶型PRRの機能および産生機構の詳細に関する知見は十分でない。本研究で、3種類のプロテアーゼが関与するPRRの多段階切断の新モデル、ならびにヘパリン/ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合性という新しい性質が明らかになったことで、可溶型PRRの機能解明だけでなく、関連する疾病の発症・進展機構の解明にも役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：Using Chinese hamster ovary (CHO) cells exogenously expressing human (pro) renin receptor (PRR) and cleavage site-specific antibodies, we found that the C-terminal Arg278 residue is removed by carboxypeptidase after stepwise cleavage of PRR by site-1 protease (RTIL281) and furin (RKTR278). Heparin column chromatography showed that excision of the C-terminal Arg278 residue decreased the heparin-binding ability. It is possible that the multistep cleavage of PRR may serve as a mechanism by which cells produce various soluble PRRs with different binding properties to heparan sulfate proteoglycans on the cell surface.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：（プロ）レニン受容体　ATP6AP2　プロセシング酵素　ヘパリン結合　ヘパラン硫酸プロテオグリカン
furin　site-1 protease　carboxypeptidase

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

（プロ）レニン受容体（PRR）は、血圧調節酵素レニンおよびその前駆体プロレニンと結合する１回膜貫通型受容体で、腎障害や心血管疾患の発症・進展に関わることが知られている。PRR はまた、リソソームの酸性化を担う液胞型プロトンポンプ（V-ATPase）の形成や、胚発生や腫瘍形成に重要な Wnt/β-カテニンシグナル伝達に関わるなど、多機能分子として知られる。膜結合型の全長型 PRR が細胞内プロテアーゼによって切断されて生成する遊離型の PRR は、可溶型 PRR（sPRR）と呼ばれる。sPRR は、慢性腎臓病、妊娠糖尿病、妊娠高血圧腎症、膵臓癌などの疾病でその血中濃度が上昇することから、これらの疾病のバイオマーカーとなる可能性が期待されている。これまでに我々は、全長型 PRR が site-1 protease（S1P）（$RTIL_{281}$↓）（数字はアミノ酸残基番号、矢印は切断位置を示す）と furin（$RKTR_{278}$↓）によって段階的に切断されることを明らかにし、細胞の種類や状態によって分泌される sPRR のタイプが変化することを見出している。しかし、細胞が多様な sPRR を産生する生物学的意味は明らかでない。

２．研究の目的

本研究では、PRR 中の furin 認識配列（$RKTR_{278}$）が、硫酸化多糖の一種であるヘパリンに対する結合性モチーフ BBXB（B は塩基性アミノ酸）に合致することに着目し、PRR のヘパリン結合性の検証実験を通して、多段階切断によって細胞が多様な sPRR を作り出す生物学的意味を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

(1)実験材料

①培養細胞

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞（RCB0007）およびヒト乳腺癌由来 MCF-7 細胞（RCB1904）は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研 BRC から提供された。ヒト PRR を発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞 CHO/hPRR-10His は、当研究室で樹立された（Suzuki-Nakagawa C. et al. Biochem Biophys Res Commun. 444, 461-466, 2014）。

②市販抗体

抗 PRR 抗体（GTX114169）は GeneTex 社、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体（170-6515）はバイオラッド社、Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体（711-545-152）は Jackson ImmunoResearch 社から購入した。

③切断部位特異的抗体

S1P 切断によって生じるヒト sPRR の C 末端部-$RTIL_{281}$、furin 切断によって生じる-$RKTR_{278}$、および furin 切断末端から R 残基が除去されて生じる-RKT_{277}を標的とする抗体（図１）は、医学生物学研究所に委託して本研究室で作製した独自の抗体を用いた。

(2)実験方法

①組換え型ヒト sPRR の調製

N17-L281、N17-R278、N17-T277、および furin 認識配列 $RKTR_{278}$を欠損させた N17-I274（図１参照）の４種類のヒト sPRR を大腸菌で生産し、精製して使用した。これら４種類の sPRR を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）した後、CBB 染色、ならびに切断部位特異的抗体および細胞外領域に対する市販の抗 PRR 抗体を用いたイムノブロットにより解析した。

②細胞が産生する sPRR の解析

CHO/hPRR-10His 細胞の細胞溶解液および培養上清を SDS-PAGE し、切断部位特異的抗体および細胞外領域に対する市販の抗 PRR 抗体を用いたイムノブロットにより解析した。

③Carboxypeptidase 阻害剤処理の影響

HeLa 細胞を carboxypeptidase 阻害剤 2-guanidinoethylmercaptosuccinic acid（GEMSA）で 24 時間処理した。細胞溶解液と培養上清を SDS-PAGE 後、切断部位特異的抗体および細胞外領域に対する市販の抗 PRR 抗体を用いたイムノブロットにより解析した。

④ヘパリンカラムクロマトグラフィー

４種類の組換え型ヒト sPRR（sPRR_L281、_R278、_T277、_I274）を AKTAprime plus（GE ヘルスケア社）制御下、ヘパリンカラム（GE ヘルスケア社）に供し、50-240 mM NaCl の直線的濃度勾配をかけて溶出した。

⑤細胞表面への結合実験

MCF-7 細胞を、0、30、60 mM の塩素酸ナトリウム $NaClO_3$で処理した。固定した細胞に、組換え型ヒト sPRR_L281 を反応させた後、結合した sPRR を、1 次抗体に抗 PRR 抗体、2 次抗体に Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて検出した。各ウェルの Alexa 488 の蛍光強度を H33342（核染色）の蛍光強度で除すことで標準化を行った。

４．研究成果

（１）大腸菌を用いた組換え型 sPRR の生産と精製

組換え型 sPRR 標品は SDS-PAGE 後の CBB 染色で単一バンドを示し、高純度であると確認された（図２A）。それらの移動度にはわずかな違いが認められ、鎖長の違いによると考えられた。市販の抗 PRR 抗体は 4 種類全ての sPRR と交叉したのに対して、当研究室で作製した 3 種類の切断部位特異的抗体は対応する sPRR とのみ交叉し、高い選択性をもつことが確認された（図２B）。

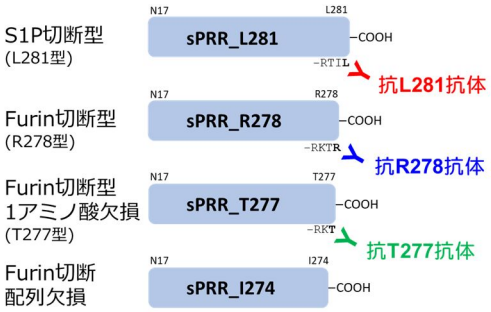

図１　本研究で用いた切断部位特異的抗体

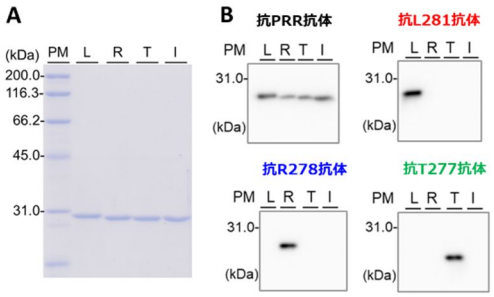

図２　切断部位特異的抗体の特異性

大腸菌で生産した4種類の組換え型sPRR（L281型(L)，R278型(R)，T277型(T)，I274型(I)）をSDS-PAGE後、(A) CBB染色により全タンパク質を可視化した。(B) 切断部位特異的抗体および細胞外領域に対する市販の抗PRR抗体を用いたイムノブロットにより検出した。PM: マーカー

（２）CHO/hPRR-10His 細胞が産生する sPRR の解析

PRR の段階的切断の詳細を解析するために、ヒト PRR を安定発現させた CHO/hPRR-10His 細胞の sPRR を解析した（図３）。市販の抗 PRR 抗体で細胞溶解液に全長型と sPRR、培養上清には sPRR のみが検出された。抗 L281 抗体は細胞溶解液の sPRR に交叉したが、培養上清の sPRR には交叉しなかった。このことは、細胞内の sPRR は S1P 切断型であり、furin によってさらなる切断を受けて細胞外へと分泌されるという、我々のこれまでのモデルと矛盾しない。しかし、抗 R278 抗体は、予想に反して、いずれの sPRR にも交叉せず、これらの sPRR が furin 切断型でないことを示唆する結果となった。前駆体タンパク質の限定分解において、C 末端 R 残基が切除される例が知られていることから、furin 切断後の C 末端 R 残基が切除されている可能性を考えた。そこで抗 T277 抗体を作製して解析したところ、抗 T277 抗体は培養上清の sPRR に交叉した。このことから、sPRR は furin で切断された後、さらに C 末端 R278 残基が切除されることが明らかになった。T277 型 sPRR の存在はこれまで報告がなく、学術的に新規な知見である。

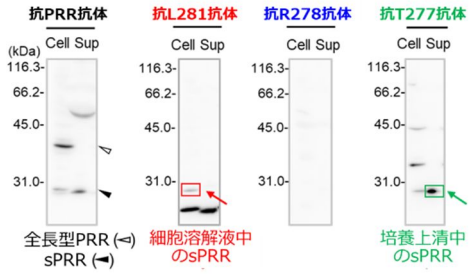

図３　CHO/hPRR-10His細胞における sPRR型の解析

CHO/hPRR-10His細胞の細胞溶解液(Cell)と培養上清(Sup)をSDS-PAGE後、切断部位特異的抗体および細胞外領域に対する抗PRR抗体を用いたイムノブロットにより解析した。

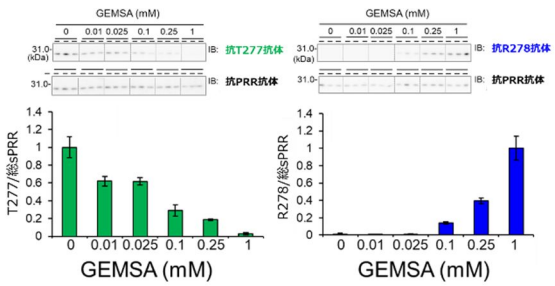

図４　Carboxypeptidase 阻害剤処理が sPRR型に及ぼす影響

HeLa細胞をcarboxypeptidase阻害剤GEMSAで24時間処理後、培養上清をSDS-PAGEし、切断部位特異的抗体および細胞外領域に対する抗PRR抗体を用いたイムノブロットにより解析した。

（３）Carboxypeptidase の関与

Furin 切断後の C 末端 R278 残基の切除を carboxypeptidase が行っている可能性を検証するため、HeLa 細胞を carboxypeptidase 阻害剤 GEMSA で処理し、sPRR の型に及ぼす影響を調べた。その結果、GEMSA 濃度依存的に T277 型 sPRR 量が減少し、それに応じて R278 型 sPRR 量が増加した（図４）。また、siRNA で carboxypeptidase を減少させると T277 型が減少し、R278 型が増加した(data not shown)。このことから、furin 切断後の sPRR の C 末端 R278 残基を carboxypeptidase が切除することが明らかになった。

（４）sPRR のヘパリン結合性

S1P 切断型の L281 型 sPRR、furin 切断型の R278 型 sPRR、carboxypeptidase 切断型の T277 sPRR、および furin 認識配列を欠損させた I274 sPRR は全てヘパリンカラムに結合した（図５）。その結合能は、ヘパリン結合性モチーフ BBXB に合致する furin 認識配列 RKTR を欠損させた I274 が 4 つの中で最も低く、次いでヘパリン結合性モチーフを一部欠く T277 型であり、L281 型と R278 型は同等のヘパリン結合能を示した。これら sPRR のカラムからの溶出は生理的塩濃度付近で起きたことから、sPRR の C 末端部のヘパリン結合性モチーフは、生理的塩濃度付近でのヘパリン結合性に影響することが明らかになった。

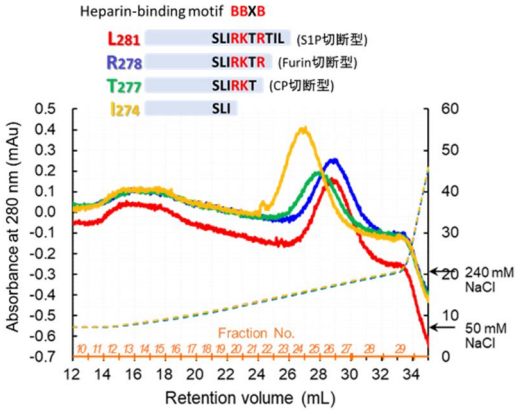

図５　異なるC末端をもつsPRRのヘパリン結合性

大腸菌で生産した4種類の組換え型ヒトsPRRをヘパリンカラムに供し、50-240 mM NaClで溶出した。

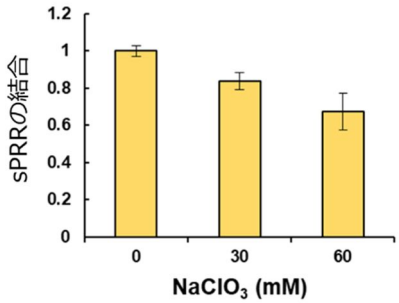

図６　sPRRの細胞表面への結合

MCF7細胞を塩素酸ナトリウム$NaClO_3$で処理した。固定した細胞に組換え型ヒトsPRR_L281を反応させた後、細胞表面に結合したsPRRを抗PRR抗体を用いた蛍光免疫染色法により検出した。

（５）sPRR の細胞表面への結合

細胞表面には、ヘパリンと同じく硫酸化多糖の一種であるヘパラン硫酸鎖をもったヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）が存在している。MCF-7 細胞を用いた結合実験の結果、sPRR は細胞に結合し、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸化を阻害することが知られる塩素酸ナトリウム $NaClO_3$ で細胞を処理すると、sPRR の結合量が減少した（図６）。このことから、sPRR は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンを介して細胞に結合することが示唆された。

（６）細胞が多様な可溶型（プロ）レニン受容体を産生する生物学的意味

本研究で、可溶型 PRR の C 末端を標的とする独自の抗体を用いて、PRR の段階的切断に関する新たな知見を得た。すなわち、膜貫通型の PRR を site-1 protease（S1P）が切断（$RTIL_{281}$↓）することで産生された sPRR の C 末端 3 残基を furin（$RKTR_{278}$↓）が切除した後、さらに carboxypeptidase が C 末端の R 残基を切除し、T277 型 sPRR が作られることを見出した（図７）。

Furin 認識配列がヘパリン結合性モチーフ BBXB に合致することに着目し、本研究では PRR のヘパリン結合性を検証し、これを実証した。また、sPRR の型によって、ヘパリン結合能に違いがあることが明らかになった。ヘパリン結合性を示すタンパク質は、細胞表面の HSPG と相互作用することで、その安定性、細胞間隙での拡散性、受容体との結合が制御されているものがある。PRR の多段階切断は、細胞が、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの結合能が異なる sPRR を作り出す仕組みとして機能している可能性が考えられる。

本研究で得られた知見は、sPRR の機能解明への糸口になるだけでなく、PRR が関わる疾病の発症・進展機構の解明に役立つと期待される。

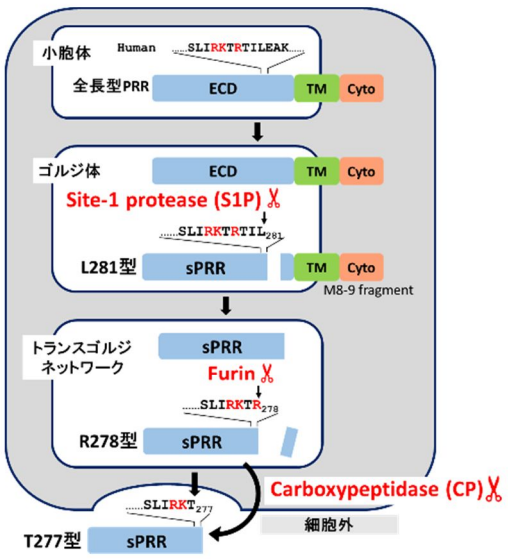

図７　PRRの多段階切断（新モデル）

膜結合型の全長型PRRは、site-1 protease (S1P) (RTIL281↓)、次いでfurin (RKTR278↓)によって切断され、さらにcarboxypeptidase (CP)によってC末端Arg278残基が切除される。

ECD: 細胞外/内腔領域、TM: 膜貫通領域、Cyto: 細胞質領域

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 上村葉月、中川千春、深津萌々花、橋本美涼、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅
２．発表標題 （プロ）レニン受容体の多段階プロセシングとその生物学的意味
３．学会等名 第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
４．発表年 2019年

１．発表者名 深津萌々花、上村葉月、中川千春、橋本美涼、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅
２．発表標題 可溶型（プロ）レニン受容体は複数のヘパリン結合部位をもつ
３．学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会
４．発表年 2019年

１．発表者名 上村葉月，中川千春，野村健太，小澤諒祐，深津萌々花，海老原章郎，鈴木文昭，中川寅
２．発表標題 (プロ)レニン受容体のヘパリン結合性
３．学会等名 第82回日本生化学会中部支部例会
４．発表年 2018年

１．発表者名 中川 千春，浅野 栞奈，上村 葉月，深津 萌々花，浅見 映理子，海老原 章郎，鈴木 文昭，中川寅
２．発表標題 可溶型（プロ）レニン受容体のC末端トリミング
３．学会等名 第91回日本生化学会大会
４．発表年 2018年

１．発表者名
中川千春，橋本美涼，海老原章郎，鈴木文昭，中川寅

２．発表標題
可溶型（プロ）レニン受容体のC末端トリミング

３．学会等名
血圧とホルモン科学協会　第11回（プロ）レニン受容体フォーラム

４．発表年
2019年

１．発表者名
中川　寅，中川千春，海老原章郎，鈴木文昭

２．発表標題
可溶型(プロ)レニン受容体のヘパリン結合性

３．学会等名
血圧とホルモン科学協会 第10回（プロ）レニン受容体フォーラム

４．発表年
2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕
上村葉月、中川千春、深津萌々花、橋本美涼、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅：（プロ）レニン受容体の多段階プロセシングとその生物学的意味（学会奨励賞受賞発表記録）．日本病態プロテアーゼ学会News Letter、No.43、pp.13-14、2020

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考